



TITLE:

Molecular breeding of functional spinaches
rich in folate and betacyanin based on
metabolome analysis(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ohtani, Yuta

CITATION:

Ohtani, Yuta. Molecular breeding of functional spinaches rich in folate and betacyanin
based on metabolome analysis. 京都大学, 2020, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22487>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	大谷優太
論文題目	Molecular breeding of functional spinaches rich in folate and betacyanin based on metabolome analysis (メタボローム解析に基づく葉酸及びベタシアニン富化機能性ホウレンソウの育種)		
(論文内容の要旨)			
<p>高齢化社会やストレス社会の現代において、健康に対する関心は非常に高い。健康維持の為に自然治癒力を維持しつつ、病気になるリスクを回避することは大きな課題となっている。そのため、病気を治療するのではなく予防することが求められており、健康的な食生活を心掛けることで免疫力を高めることが重要視されている。そのために、効率的に食品から高い力価の栄養を摂取することのできる機能性食品の需要が増えている。これまでに様々な機能性食品が作成されてきたが、そのほとんどは遺伝子操作を施したものである。しかし、遺伝子組み換え作物は生産と流通が厳しく制限されるため実用的とはいえない。そこで本研究では、非遺伝学的な方法を用いて特定の機能性成分を豊富に含む機能性食品の創製を試みた。</p>			
1. 水耕栽培によるホウレンソウの葉酸富化			
<p>食品として栄養素を豊富に含むホウレンソウを選択し、栽培法としては多収穫が見込める水耕栽培を導入した。研究戦略としては、まず生合成経路に影響を与え、目的の機能性成分の合成量を上昇させると期待される候補化合物を液体肥料に添加しホウレンソウに吸収させる。その後、加えた化合物による目的の機能性成分量の変化をターゲットメタボロミクスによって比較し、その機能性成分量を上昇させる有用な化合物を決定するという方法を用いた。</p>			
<p>まず初めに、機能性成分として人体に不可欠な葉酸を選択した。葉酸は核酸やタンパク質の生合成、赤血球の生産、体細胞の分化と増殖など、我々の体内で多くの役割を持つ。ホウレンソウの葉酸合成量を増加させるために、生合成経路から推定したグルタミン酸、フェニルアラニン、マグネシウムイオンを候補として液体肥料に添加し、生育させた。グルタミン酸は葉酸生合成経路における前駆体であり、グルタミン酸の添加により葉酸合成が活性化されると期待できる。また、フェニルアラニンの供給によりフェニルアラニン合成酵素がフィードバック阻害され、葉酸生合成の前駆体合成に反応が傾くと期待される。さらに、マグネシウムは葉酸生合成に関与するGTP cyclohydrolase I などの酵素の活性を高める報告があり、添加効果が期待できる。栽培後のホウレンソウ抽出液の葉酸含有量を分析した結果、フェニルアラニンを添加したサンプルにおいて葉酸含有量が2倍上昇していた。また、グルタミン酸を添加したサンプルでは1.4倍上昇した。さらに、フェニルアラニンを添加したホウレンソウでは、葉酸の生合成経路における代謝変動により葉酸含有量の増加がもたらされたと考えられるので、葉酸生合成の中間体であるDihydroneopterin (DHN) とp-Amino benzoic acid (PABA) を定量化したところ、DHNは1.6倍増加し、PABAは1.4倍増加した。こ</p>			

のように、非遺伝学的な方法を用いて機能性成分である葉酸の合成量を増加させることに成功した。

2. 赤茎ハウレンソウの赤色色素の検出とベタシアニン富化

植物の赤色色素の1つにベタシアニンが存在するが、その生合成メカニズムと生物学的機能はよくわかっていない。いくつかの研究では、ベタシアニンに強力な抗酸化活性があることも報告されている。さらに、最近、ベタシアニンは抗発癌性を有し、悪性細胞の増殖を抑制できることも示されている。そこで、ハウレンソウ中のベタシアニン量を上昇せることを目的とした。

初めに、通常のハウレンソウと赤茎ハウレンソウ（アカリ、ミンスター）の抽出物を比較し、赤茎ハウレンソウの赤茎部の赤色色素がベタシアニンの1つであるベタニン由来であることをLC-MS分析により証明した。さらに、赤茎ハウレンソウのベタニン合成量を増加させるために、チロシン、ドーパミン、カルシウムイオン、スクロースを候補として液体肥料に添加し、生育させた。チロシンとドーパミンはベタニン生合成の前駆体であり、添加により生合成を活性化すると予想される。カルシウムイオンは、ベタニン合成量を増やすエリシターとして知られている。また、スクロースは、二次代謝産生のリソースとなり、ベタニン生合成に関与する遺伝子発現レベルを調節する可能性があることが報告されている。栽培後の赤茎ハウレンソウのベタニン含有量を分析した結果、ドーパミンを添加したサンプルにおいてベタニン含有量が3倍上昇し、スクロースを添加したサンプルでは5倍上昇した。さらに、ベタニンによる抗酸化力を測定したところ、ドーパミンとスクロースを添加したサンプルでは抗酸化活性に有意な上昇が見られた。これらの結果から、生合成経路に関与する化合物を与えることで赤茎ハウレンソウのベタニン合成量が増加し、非遺伝学的な方法による機能性成分の富化の有用性が証明された。

3. 細径化ロングモノリスカラムによるシリカモノリスキャピラリーnano LC-MS分析の検出感度向上

これまで以上に存在量が少ない機能性成分をターゲットにする場合、通常のLC-MS分析では感度が十分でなく、目的の化合物を検出できない可能性がある。これを解決するためにはLC-MS分析での検出感度を上昇させる必要がある。そのため、モノリスカラムを導入し、それらの内径や長さで検出感度の関係性を評価し、モノリスカラムの細さ・長さを調整することの有用性を検討した。特に、メタボロミクスに加えてプロテオミクスにも応用できるようにするために、BSA（ウシ血清アルブミン）を標品に用いて評価した。そこで、モノリスカラムを細径化することで、Multiple Reaction Monitoring (MRM) におけるLC-MSの検出感度を上昇させることを目指した。

初めに、BSA消化物から得られるペプチド断片から感度の高い10個のペプチドを選択しMRMメソッドを作成した。内径が100 μm で2種類の長さ（500 mmと1000 mm）のモノリスカラムを用いてBSA消化物を分析し、長さの違いによる分離効率の影響を

ピークキャパシティを用いて評価したところ、カラムを長くすることで分離効率が1.8倍上昇した。次に、2種類の内径（100 μm と75 μm ）のモノリスカラムを用いて分離効率と検出感度を評価した。分析の結果、内径を小さくすることで分離効率が1.4倍向上し、10個中9個のペプチドでピーク面積が上昇し、平均して2.28倍の上昇が見られた。

さらに、細径化による検出感度の向上を評価するためにS/N比を比較すると、10個全てのペプチドにおいてS/N比の向上が見られた。最後に、10個の中から最も感度の高かった2つのペプチドを用いて検出限界を比較したところ、細径化キャピラリーモノリスカラムを用いることでアトモルレベルのペプチドを検出できることが明らかとなった。これらの結果から、細径化ロングモノリスカラムの有用性を示し、様々な機能性成分を拡大して対象にできる可能性を示唆した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

特定の栄養素を豊富に含む機能性食品の需要が増える中で様々な機能性食品が作成されてきたが、そのほとんどは遺伝子操作によるものである。しかし、遺伝子組み換え作物は生産と流通が厳しく制限されるため実用的とはいえない。本研究では非遺伝学的な方法を用いて特定の機能性成分を豊富に含む機能性食品の創製を試みた。食品には栄養素を豊富に含むホウレンソウを選択し、水耕栽培を導入した。生合成経路に影響を与え、目的の機能性成分の合成量を上昇させると期待される候補化合物を液体肥料に添加しホウレンソウに吸収させた。栽培後に機能性成分量の変化をターゲットメタボロミクスによって比較し、目的の機能性成分量を上昇させる有用な化合物を決定することでホウレンソウの機能化に成功した。評価すべき点は以下の3点である。

1. 葉酸を富化した機能性ホウレンソウの育種を目指して、水耕栽培の液体肥料にフェニルアラニンとグルタミン酸を添加しホウレンソウを栽培することで、葉酸含有量をフェニルアラニン添加で2倍、グルタミン酸添加で1.4倍上昇させることに成功した。
2. 赤茎ホウレンソウの赤色色素がベタニン由来であることを示し、ドーパミンとスクロースを水耕栽培の液体肥料に添加して赤茎ホウレンソウを栽培することで、ベタニン含有量をドーパミン添加で3倍、スクロース添加で5倍上昇させることに成功した。また、これらの赤茎ホウレンソウではベタニンによると考えられる抗酸化活性が上昇していることも示した。
3. 細径化ロングキャピラリーモノリスカラムを導入し、モノリスカラムを長くすることで分離効率が向上することを示した。また、細径化により検出感度が向上し、アトモルレベルの分析対象を検出できることも示した。

以上のように、本論文は、液体培地に安価な代謝関連化合物を添加することでホウレンソウの機能性成分量を上昇させることに成功した。加えて、さらなる機能性成分への応用を可能にするために、細径化ロングモノリスカラムを導入しLC-MS分析の分離効率・検出感度を向上させることに成功した。これらの結果は、生体高分子化学、栄養化学、分析化学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年2月7日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）